PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07D 417/06, 493/04, C12P 17/08, A01N 43/78, A61K 31/425 // (C07D 493/04, 313:00, 303:00)

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/22461**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. Mai 1998 (28.05.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06442

(22) Internationales Anmeldedatum: 18. November 1997 (18.11.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 47 580.5 18. November 1996 (18.11.96) DE
197 07 506.1 25. Februar 1997 (25.02.97) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D–38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: REICHENBACH, Hans [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D–38124 Braunschweig (DE). HÖFLE, Gerhard [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D–38124 Braunschweig (DE). GERTH, Klaus [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D–38124 Braunschweig (DE). STEINMETZ, Heinrich [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D–38124 Braunschweig (DE).

(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D–81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

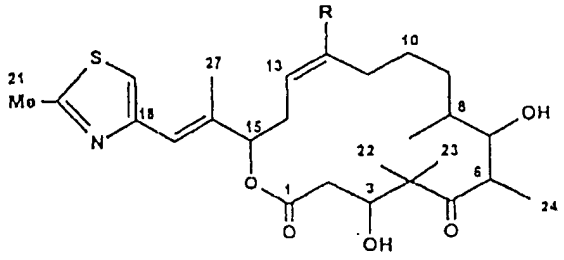
Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: EPOTHILONE C, D, E AND F, PRODUCTION PROCESS, AND THEIR USE AS CYTOSTATIC AS WELL AS PHYTOSANITARY AGENTS

(54) Bezeichnung: EPOTHILONE C, D, E UND F, DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG ALS CYTOSTATISCHE MITTEL BZW. ALS PFLANZENSCHUTZMITTEL

(57) Abstract

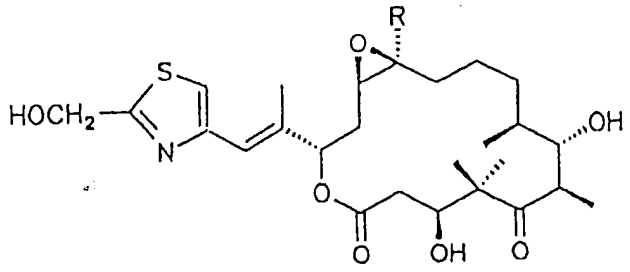
The present invention concerns the epothilone, especially epothilone C (R = hydrogen) and epothilone D (R = methyl) of formula (I), as well as epothilone E (R = hydrogen) and epothilone F (R = methyl) of formula (II), the production process and their application for producing therapeutic agents, including cytostatic agents, as well as phytosanitary agents.



(I)

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilone, insbesondere Epothilon C (R = Wasserstoff) und Epothilon D (R = Methyl) der Formel (I) sowie Epothilon E (R = Wasserstoff) und Epothilon F (R = Methyl) der Formel (II), deren Herstellung, sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen, insbesondere cytostatischen Mitteln sowie Mitteln für den Pflanzenschutz.



(II)

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

EPOTHILONE C, D, E UND F, DEREN HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG ALS CYTOSTATISCHE MITTEL BZW. ALS PFLANZENSCHUTZMITTEL

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilone C, D, E und F, deren Herstellung sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.

Epothilone C und D

Gemäß einer Ausführungsform betrifft die Erfindung Epothilone [C und D], die dadurch gewinnbar sind, daß man

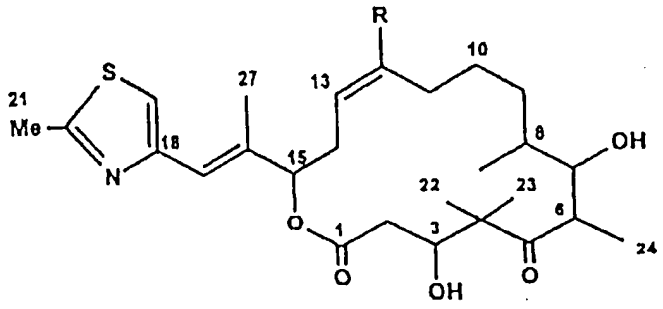
(a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert,
(b) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt und mit einem Wasser/Methanol-Gemisch wäscht,
(c) das gewaschene Adsorberharz mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,

BESTÄTIGUNGSKOPIE

(d) das gewonnene Konzentrat mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und zwischen Methanol und Hexan verteilt,
(e) die methanolische Phase zu einem Raffinat einengt und das Konzentrat an einer Sephadex-Säule fraktioniert,
(f) eine Fraktion mit Stoffwechselprodukten des eingesetzten Mikroorganismus gewinnt,
(g) die gewonnene Fraktion an einer C18-Umkehrphase mir einem Methanol/Wasser-Gemisch chromatographiert und in zeitlicher Reihenfolge
- nach einer ersten Fraktion mit Epothilon A und
- einer zweiten Fraktion mit Epothion B
- eine dritte Fraktion mit einem ersten weiteren Epothilon und
- eine vierte Fraktion mit einem zweiten weiteren Epothilon gewinnt und
(h1) und das Epothilon der ersten weiteren Fraktion und/oder
(h2) das Epothilon der zweiten weiteren Fraktion isoliert.

Ferner betrifft die Erfindung ein Epothilon [C] der Summenformel $C_{26}H_{39}NO_5S$, gekennzeichnet durch das ^1H- und ^{13}C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

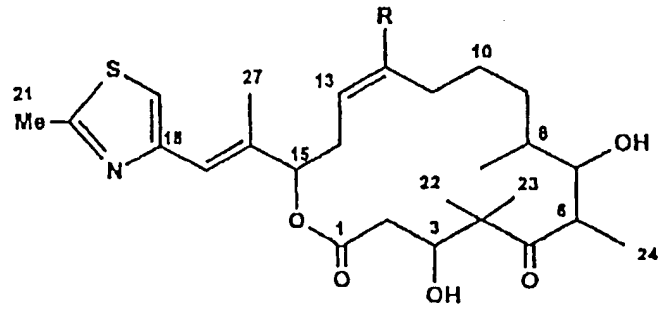
Ferner betrifft die Erfindung Epothilon C der Formel:



Epothilon C R = H

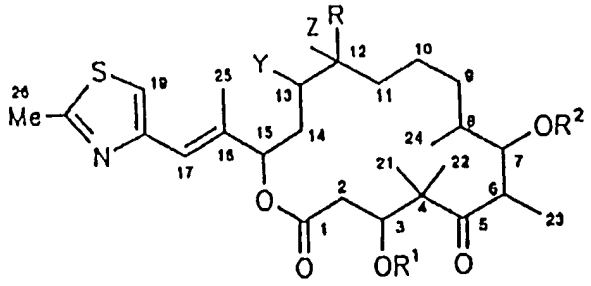
Ferner betrifft die Erfindung Epothilon [D] der Summenformel $C_{27}H_{41}NO_5S$, gekennzeichnet durch das ^1H- und ^{13}C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

Ferner betrifft die Erfindung Epothilon D der Formel:



Epothilon D R = CH_3

Epothilone C und D können zur Herstellung der Verbindungen der folgenden **Formel 1** verwendet werden, wobei zu deren Derivatisierung auf die in WO-A-97/19 086 beschriebenen Derivatisierungsmethoden verwiesen werden kann.



1

In der vorstehenden **Formel 1** bedeuten:

R = H, C_{1-4}-Alkyl;
R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}-Alkyl,

C_{1-6}-Acyl-Benzoyl,
C_{1-4}-Trialkylsilyl,
Benzyl,
Phenyl,
C_{1-6}-Alkoxy-,
C_6-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;

wobei auch zwei der Reste R^1 bis R^5 zu der Gruppierung $-(CH_2)_n-$ mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt;
Y und Z sind entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Wasserstoff, Halogen, wie F, Cl, Br oder J, Pseudohalogen, wie -NCO, -NCS oder $-N_3$, OH, O-(C_{1-6})-Acyl, O-(C_{1-6})-Alkyl, O-Benzoyl. Y und Z können auch das O-Atom eines Epoxides sein, wobei Epothilon A und B nicht beansprucht werden, oder eine der C-C-Bindungen einer C=C-Doppelbindung bilden.

So kann man die 12,13-Doppelbindung selektiv
- hydrieren, beispielsweise katalytisch oder mit Diimin, wobei man eine Verbindung der **Formel 1** mit Y = Z = H erhält; oder
- epoxidieren, beispielsweise mit Dimethyldioxiran oder einer Persäure, wobei man eine Verbindung der **Formel 1** mit Y mit Z = -O- erhält; oder
- in die Dihalogenide, Dipseudohalogenide oder Diazide umwandeln, wobei man eine Verbindung der **Formel 1** mit Y und Z = Hal, Pseudo-hal oder N_3 erhält.

Epothilone E und F

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Biotransformant von Epothilon A, der dadurch gewinnbar ist, daß man

(a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon A versetzt,

(b) die mit Epothilon A versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,

(c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,

(d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,

(e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial:	Nucleosil 100 C-18 7 µm
Säulenmaße:	250 x 16 mm
Laufmittel:	Methanol/Wasser = 60 : 40
Fluß:	10 ml/min

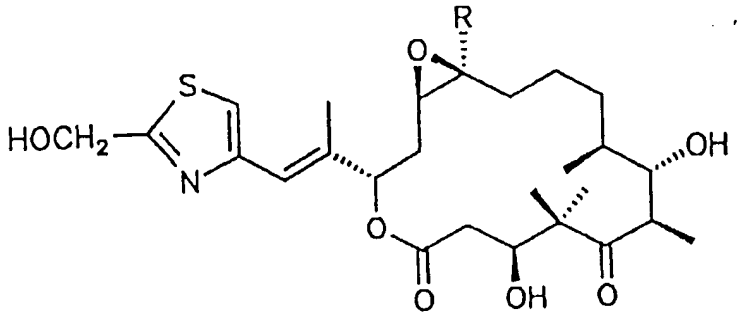
und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem R_t-Wert von 20 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon A, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon A, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung der Summenformel $C_{26}H_{39}NO_7S$, gekennzeichnet durch folgendes ^1H-NMR-Spektrum (300 MHz, $CDCl_3$): delta = 2.38 (2-H_a), 2.51 (2-H_b), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9-H_2, 10-H_2, 11-H_2), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14-H_a), 2.07 (14-H_b), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21-H_2), 1.05 (22-H_3), 1.32 (23-H_3), 1.17 (24-H_3), 0.97 (25-H_3), 2.04 (27-H_3)

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung (Epothilon E) der Formel:



Epothilon E R = H

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Biotransformant von Epothilon B, der dadurch gewinnbar ist, daß man

(a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon B versetzt,

(b) die mit Epothilon B versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,

(c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,

(d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,

(e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial:	Nucleosil 100 C-18 7 μm
Säulenmaße:	250 x 16 mm
Laufmittel:	Methanol/Wasser = 60 : 40
Fluß:	10 ml/min

und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem R_t-Wert von 24,5 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

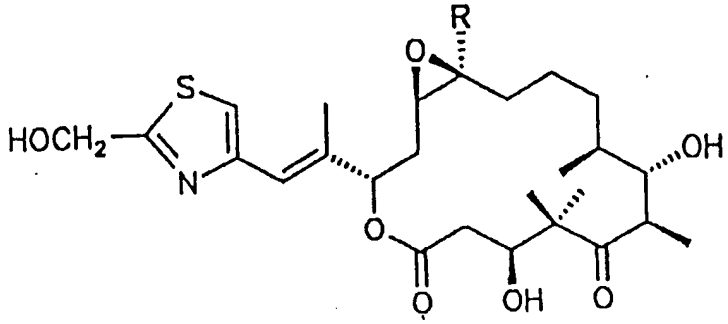
Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon B, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

Ferner betrifft die Erfindung einen derartigen Biotransformant von Epothilon B, der dadurch gewinnbar ist, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung der Summenformel $C_{27}H_{41}NO_7S$, gekennzeichnet durch folgendes ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MH_z, $CDCl_3$): delta = 2.37 (2-H_a), 2.52 (2-H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9-H_2, 10-H_2, 11-H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14-H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H),

7.10 (19-H), 4.89 (21-H_2), 1.05 (22-H_3), 1.26 (23-H_3), 1.14 (24-H_3), 0.98 (25-H_3), 1.35 (26-H_3), 2.06 (27-H_3).

Ferner betrifft die Erfindung eine Verbindung (Epothilon F) der Formel:



Epothilon F R = CH_3

Herstellung und Mittel

Die erfindungsgemäßen Verbindungen bzw. Epothilone sind mit den vorstehend angeführten Maßnahmen gewinnbar.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone C, D, E und F bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilone neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten zeigen und/oder Immunsuppression bewirken

und/oder zur Bekämpfung maligner Tumore eingesetzt werden, wobei sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1:
Epothilone C und D

A. Produktionsstamm und Kulturbedingungen entsprechend dem Epothilon Basispatent DE-B-41 38 042.

B. Produktion mit DSM 6773

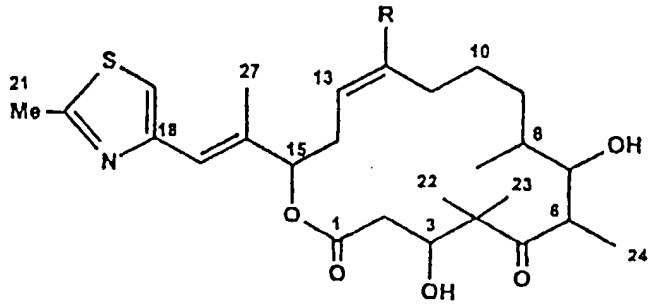
75 l Kultur werden wie im Basispatent beschrieben angezogen und zum Animpfen eines Produktionsfermenters mit 700 l Produktionsmedium aus 0.8 % Stärke, 0.2 % Glukose, 0.2 % Soyamehl, 0.2 % Hefeextrakt, 0.1 % $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0.1 % $MgSO_4 \times 7H_2O$, 8 mg/l Fe-EDTA, pH = 7.4 und optional 15 l Adsorberharz Amberlite XAD-16 verwendet. Die Fermentation dauert 7 - 10 Tage bei 30 C, Belüftung mit 0.1 NL/m^3. Durch Regulierung der Drehzahl wird der pO_2 bei 30 % gehalten.

C. Isolierung

Das Adsorberharz wird mit einem 0.7 m^2, 100 mesh Prozeßfilter von der Kultur abgetrennt und durch Waschen mit 3 Bettvolumen Wasser/Methanol 2:1 von polaren Begleitstoffen befreit. Durch Elution mit 4 Bettvolumen Methanol wird ein Rohextrakt gewonnen, der i. Vak. bis zum Auftreten der Wasserphase eingedampft wird.

Diese wird dreimal mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Eindampfen der organischen Phase ergibt 240 g Rohextrakt, der zwischen Methanol und Heptan verteilt wird, um lipophile Begleitstoffe abzutrennen. Aus der Methanolphase werden durch Eindampfen i. Vak. 180 g Raffinat gewonnen, das in drei Portionen über Sephadex LH-20 (Säule 20 x 100 cm, 20 ml/min Methanol) fraktioniert wird. Die Epothilone sind in der mit 240 - 300 min Retentionszeit eluierten Fraktion von insgesamt 72 g enthalten. Zur Trennung der Epothilone wird in drei Portionen an Lichrosorb RP-18 (15 µm, Säule 10 x 40 cm, Laufmittel 180 ml/min Methanol/Wasser 65:35) chromatographiert. Nach Epothilon A und B werden mit R_t = 90-95 min Epothilon C und 100-110 min Epothilon D eluiert und nach Eindampfen i. Vak. in einer Ausbeute von jeweils 0.3 g als farblose Öle gewonnen.

D. Physikalische Eigenschaften



Epothilon C R = H
Epothilon D R = CH_3

Epothilon C

$C_{26}H_{39}NO_5S$ [477]
ESI-MS: (positiv Ionen): 478.5 für $[M+H]^+$

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82
DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1
Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 11,5 min
Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35
Fluß: 1ml/min
Detection: Diodenarray

Epothilon D

$C_{27}H_{41}NO_5S$ [491]
ESI-MS: (positiv Ionen): 492,5 für $[M+H]^+$

1H und 13C siehe NMR-Tabelle

DC:R_f = 0,82
DC-Alufolie 60 F 254 Merck, Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1
Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC:R_t = 15,3 min
Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 125 x 4 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 65:35
Fluß: 1ml/min
Detection: Diodenarray

Tabelle 1: ^{1}H- und ^{13}C-NMR Daten von Epothilon C und Epothilon D in [D_6] DMSO bei 300 MHz

	Epothilon C			Epothilon D		
H-Atom	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)	δ (ppm)	C-Atom	δ (ppm)
		1	170.3		1	170.1
2-Ha	2.38	2	38.4	2.35	2	39.0
2-Hb	2.50	3	71.2	2.38	3	70.8
3-H	3.97	4	53.1	4.10	4	53.2
3-OH	5.12	5	217.1	5.08	5	217.4
6-H	3.07	6	45.4	3.11	6	44.4
7-H	3.49	7	75.9	3.48	7	75.5
7-OH	4.46	8	35.4	4.46	8	36.3
8-H	1.34	9	27.6	1.29	9	29.9
9-Ha	1.15	10	30.0	1.14	10	25.9
9-Hb	1.40	11	27.6	1.38	11	31.8*
10-Ha	1.15*	12	124.6	1.14*	12	138.3
10-Hb	1.35*	13	133.1	1.35*	13	120.3
11-Ha	1.90	14	31.1	1.75	14	31.6*
11-Hb	2.18	15	76.3	2.10	15	76.6
12-H	5.38**	16	137.3		16	137.2
13-H	5.44**	17	119.1	5.08	17	119.2
14-Ha	2.35	18	152.1	2.30	18	152.1
14-Hb	2.70	19	117.7	2.65	19	117.7
15-H	5.27	20	164.2	5.29	20	164.3
17-H	6.50	21	18.8	6.51	21	18.9
19-H	7.35	22	20.8	7.35	22	19.7
21-H_3	2.65	23	22.6	2.65	23	22.5
22-H_3	0.94	24	16.7	0.90	24	16.4
23-H_3	1.21	25	18.4	1.19	25	18.4
24-H_3	1.06	27	14.2	1.07	26	22.9
25-H_3	0.90			0.91	27	14.1
26-H_3				1.63		
27-H_3	2.10			2.11		

*, ** Zuordnung vertauschbar

Beispiel 2:
Epothilon A und 12,13-Bisepi-epothilon A aus Epothilon C

50 mg Epothilon A werden in 1.5 ml Aceton gelöst und mit 1.5 ml einer 0.07 molaren Lösung von Dimethyldioxiran in Aceton versetzt. Nach 6 Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird i. Vak. eingedampft und durch präparative HPLC an Kieselgel (Laufmittel: Methyl-tert.butylether/Petrolether/Methanol 33:66:1) getrennt.

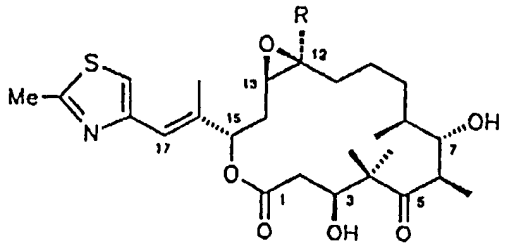
Ausbeute:

25 mg Epothilon A, R_t = 3,5 min (analyt. HPLC, 7 µm, Säule 4 x 250 mm, Laufmittel s. o., Fluß 1.5 ml/min)

und

20 mg 12,13-Bisepi-epothilon A, R_t = 3.7 min, ESI-MS (pos. Ionen)

m/z = 494 $[M+H]^+$
^{1}H-NMR in $[D_4]$ Methanol, ausgewählte Signale: delta = 4.32 (3-H), 3.79 (7-H), 3.06 (12-H), 3.16 (13-H), 5.54 (15-H), 6.69 (17-H), 1.20 (22-H), 1.45 (23-H).



12,13-Bisepi-epothilon A R = H

Beispiel 3:
Epothilon E und F, neue Biotransformationsprodukte der Epothilone A und B.

Produktionsstamm:
Der Produktionsstamm *Sorangium cellulosum* So ce90 wurde im Juli 1985 an der GBF aus einer Bodenprobe von den Ufern des Zambesi isoliert und am 28.10.91 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter Nr. DSM 6773 hinterlegt.

Die Charakterisierung des Produzenten sowie die Kulturbedingungen sind beschrieben in:
Höfle, G.; N. Bedorf, K. Gerth & H. Reichenbach: Epothilone, deren Herstellungsverfahren sowie sie enthaltende Mittel.
DE 41 38 042 A1, offengelegt am 27. Mai 1993.

Bildung der Epothilone E und E während der Fermentation:

Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 100 l Bioreaktor wird mit 60 l Medium (0,8 % Stärke; 0,2 % Glucose; 0,2 % Soyamehl; 0,2 % Hefeextrakt; 0,1 % $CaCl_2 \times 2H_2O$; 0,1 % $MgSO_4 \times 7H_2O$; 8 mg/l Fe-EDTA; pH 7,4) gefüllt. Zusätzlich werden 2 % Adsorberharz (XAD-16, Rohm & Haas) zugegeben. Das Medium wird durch Autoklavieren (2 Std., 120 °C) sterilisiert. Beimpft wird mit 10 l einer im gleichen Medium (zusätzlich 50 mM HEPES-Puffer pH 7,4) im Schüttelkolben angezogenen Vorkultur (160 Upm, 30 °C). Fermentiert wird bei 32 °C mit einer Rührergeschwindigkeit von 500 Upm und einer Belüftung von 0,2 Nl pro m^3 und Std, der pH Wert wird durch Zugabe von KOH bei 7,4 gehalten. Die Fermentation dauert 7 bis 10 Tage. Die gebildeten Epothilone werden während der Fermentation kontinuierlich an das Adsorberharz gebunden. Nach Abtrennen der Kulturbrühe (z. B. durch Absieben in einem Prozeßfilter) wird das Harz mit 3 Bettvolumen Wasser gewa-

schen und mit 4 Bettvolumen Methanol eluiert. Das Eluat wird zur Trockne eingeengt und in 700 ml Methanol aufgenommen.

HPLC-Analyse des XAD-Eluates:

Gegenüber dem Ausgangsvolumen des Reaktors (70 l) ist das Eluat 100:1 konzentriert. Die Analyse wird durchgeführt mit einer HPLC Anlage 1090 der Fa. Hewlett Packard. Zur Trennung der Inhaltstoffe wird eine Microbore Säule (125/2 Nucleosil 120-5 C_{18}) der Fa. Machery-Nagel (Düren) verwendet. Eluiert wird mit einem Gradienten aus Wasser/Acetonitril von anfänglich 75:25 bis zu 50:50 nach 5,5 Minuten. Dieses Verhältnis wird bis zur 7. Minute gehalten, um dann bis zur 10. Minute auf 100 % Acetonitril anzusteigen.

Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 250 nm und einer Bandbreite von 4 nm. Die Dioden Array Spektren werden im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm gemessen. Im XAD-Eluat fallen zwei neue Substanzen mit R_t 5,29 und R_t 5,91 auf, deren Adsorptionsspektren mit denen von Epothilonen A bzw. B identisch sind (Abb. 1; E entspricht A, F entspricht B). Diese Substanzen werden unter den gegebenen Fermentationsbedingungen nur in Spuren gebildet.

Biotransformation von Epothilon A und B zu Epothilon E und F:

Für die gezielte Biotransformation wird eine 4 Tage alte, mit Adsorberharz gehaltene 500 ml Kultur von So ce90 verwendet. Von dieser werden 250 ml unter Zurücklassen des XAD in einen sterilen 1 l Erlenmeyerkolben überführt. Danach wird eine methanolische Lösung einer Mischung von insgesamt 36 mg Epothilon A und 14 mg Epothilon B zugegeben und der Kolben für zwei Tage bei 30 °C und 200 Upm auf einer Schütteltruhe inkubiert. Die Bildung der Epothilone E und F wird direkt aus 10 µl des zentrifugierten Kulturüberstands analysiert (**Abb. 2**). Die Umwandlung erfolgt nur

in Gegenwart der Zellen und ist abhängig von der eingesetzten Zelldichte und der Zeit. Eine Kinetik der Umwandlung ist für Epothilon A in **Abb.** 3 dargestellt.

Isolierung von Epothilon E und F

Zur Isolierung von Epothilon E und F werden drei Schüttelkolbenansätze aus der Biotransformation (s. o.) vereinigt und 1 h mit 20 ml XAD-16 geschüttelt. Das XAD wird durch Absieben gewonnen und mit 200 ml Methanol eluiert. Das Eluat wird i. Vak. zu 1.7 g Rohextrakt eingedampft. Dieser wird zwischen 30 ml Ethylacetat und 100 ml Wasser verteilt. Aus der Ethylacetatphase werden beim Eindampfen i. Vak. 330 mg eines öligen Rückstandes erhalten, die in fünf Läufen über eine 250 x 20 mm RP-18 Säule chromatographiert werden (Laufmittel: Methanol/Wasser 58:42, Detektion 254 nm).

Ausbeute: Epothilon E 50 mg
F 10 mg

Biologische Wirkung von Epothilon E:

In Zellkulturen wurde die Konzentration bestimmt, welche das Wachstum um 50 % reduziert (IC_{50}) und mit den Werten für Epothilon A verglichen.

Zellinie	IC_{50} (ng/ml)	
	Epothilon E	Epothilon A
HeLa. KB-3.1 (human)	5	1
Mausfibroblasten, L929	20	4

Epothilon E

$C_{26}H_{39}HO_7S$ [509]
ESI-MS: (positiv Ionen): 510.3 für $[M+H]^+$

DC: R_f = 0,58
DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1
Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C

HPLC: R_t = 5,0 min
Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 250 x 4 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40
Fluß: 1,2 ml/min
Detektion: Diodenarray

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): delta = 2.38 (2-H_a), 2.51 (2-H_b), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9-H_2, 10-H_2, 11-H_2), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 (14-H_a), 2.07 (14-H_b), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 (21-H_2), 1.05 (22-H_3), 1.32 (23-H_3), 1.17 (24-H_3), 0.97 (25-H_3), 2.04 (27-H_3)

Epothilon F

$C_{27}H_{41}NO_7S$ [523]
ESI-MS: (positiv Ionen): 524.5 für $[M+H]^+$

DC: R_f = 0,58
DC-Alufolie 60 F 254 Merck. Laufmittel: Dichlormethan/Methanol = 9:1
Detektion: UV-Löschung bei 254 nm. Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz, blau-graue Anfärbung beim Erhitzen auf 120 °C.

HPLC: R_t = 5,4 min
Säule: Nucleosil 100 C-18 7µm, 250 x 4 mm
Laufmittel: Methanol/Wasser = 60:40
Fluß: 1,2 ml/min
Detektion: Diodenarray

^{1}H-NMR (300 MH_z, $CDCl_3$): delta = 2.37 (2-H_a), 2.52 (2-H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9-H_2, 10-H_2, 11-H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14-H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21-H_2), 1.05 (22-H_3), 1.26 (23-H_3), 1.14 (24-H_3), 0.98 (25-H_3), 1.35 (26-H_3), 2.06 (27-H_3).

Beispiel 4:

Herstellung von Epothilon E und F durch Biotransformation mit *Sorangium cellulosum* So ce90

1) Durchführung der Biotransformation:

Für die Biotransformation wird eine Kultur von *Sorangium cellulosum* So ce90 verwendet, die für vier Tage in Gegenwart von 2 % XAD 16 Adsorberharz (Fa. Rohm und Haas, Frankfurt/M.) bei 30 °C und 160 Upm geschüttelt wurde. Das Kulturmedium hat folgende Zusammensetzung in g/Liter destilliertem Wasser: Kartoffelstärke (Maizena), 8; Glucose (Maizena), 8; entfettetes Sojamehl, 2; Hefeextrakt (Marcor), 2; Ethylendiamintetraessigsäure, Eisen (III) Natrium Salz, 0,008; $MgSO_4$ x 7 H_2O, 1; $CaCl_2$ x 2 H_2O, 1; HEPES 11,5. Der pH-Wert wird vor dem Autoklavieren mit KOH auf 7,4 eingestellt. Das XAD wird durch Sieben über ein Edelstahlsieb (200 µm Maschenweite) von der Kultur abgetrennt. Die Bakterien werden durch Zentrifugation für 10 min bei 10 000 Upm sedimentiert und das Pellet in 1/5 des Kulturüberstandes resuspendiert. Zu der konzentrierten Bakteriensuspension wird nun Epothilon A bzw. Epothilon B in methanolischer Lösung in einer Kon-

zentration von 0,5 g/Liter zugesetzt. Die Kultur wird wie oben beschrieben weiterkultiviert. Zur Analyse der Biotransformation wird zu den gewünschten Zeiten eine 1 ml Probe entnommen, 0,1 ml XAD zugegeben und die Probe für 30 min bei 30 °C geschüttelt. Eluiert wird das XAD mit Methanol. Das Eluat wird zur Trockene eingeengt und in 0,2 ml Methanol wieder aufgenommen. Diese Probe wird über HPLC analysiert.

Abb. 4) Kinetik der Biotransformation von Epothilon A nach Epothilon E

Abb. 5) Kinetik der Biotransformation von Epothilon B nach Epothilon F.

2) Herstellung von Epothilon E durch Biotransformation von 1 g Epothilon A.

Der Stamm *Sorangium cellulosum* So ce90 wird für vier Tage in 8,5 l des obigen Mediums (jedoch ohne XAD Zusatz) in einem 10 Liter Bioreaktor bei 30 °C, einer Drehzahl von 150 Upm und einer Belüftung von 0,1 vvm angezogen.

Anschließend wird die Kultur durch cross flow Filtration auf 3 l eingeengt. Hierzu werden 0,6 m^2 einer Membran mit einer Porengröße von 0,3 μm verwendet.

Die konzentrierte Kultur wird in einen 4 Liter Bioreaktor überführt und eine methanolische Lösung von 1 g Epothilon A in 10 ml Methanol zugegeben. Anschließend wird die Kultur über einen Zeitraum von 21,5 h weiterkultiviert. Die Temperatur beträgt 32 °C, die Rührerdrehzahl 455 Upm und die Belüftung erfolgt mit 6 l/min. Zum Erntezeitpunkt wird 100 ml XAD zugegeben und für 1 h weiterinkubiert. Das XAD wird durch Absieben von den Zellen abgetrennt und erschöpfend mit Methanol eluiert. Das konzentrierte Eluat wird über HPLC analysiert.

Bilanzierung der Biotransformation:

Epothilon A eingesetzt:	1000 mg	= 100 %
Epothilon A nach 21,5 h wiedergefunden:	53,7 mg	= 5,4 %
Epothilon E nach 21,5 h gebildet:	661,4 mg	= 66,1 %
Epothilon A vollständig abgebaut:		= 28,5 %

Versuch 5:

Die erfindungsgemäßen Epothilone wurden mit Zellkulturen (Tabelle 2) und auf Polymerisationsförderung (Tabelle 3) getestet.

Tabelle 2:

Epothilon-Tests mit Zellkulturen

Epothilon	A 493	B 507	C 477	D 491	E 509	F 523
		IC-50 [ng/ml]				
Mausfibroblasten L 929	4	1	100	20	20	1,5
humane Tumorzellinien:						
HL-60 (Leukämie)	0.2	0.2	10	3	1	0,3
K-562 (Leukämie)	0.3	0.3	20	10	2	0,5
U-937 (Lymphom)	0.2	0.2	10	3	1	0,2
KB-3.1 (Cervixkarzinom)	1	0.6	20	12	5	0,5
KB-V1 (Cervixkarzinom multires	0.3	0.3	15	3	5	0,6
A-498 (Nierenkarzinom)	-	1.5	150	20	20	3
A-549 (Lungenkarzinom)	0.7	0.1	30	10	3	0,1

Tabelle 3:

Polymerisationstest mit Epothilonen

Parameter: Zeit bis zur halbmaximalen Polymerisation der Kontrolle

Messung:	w	x	y	z	Mittel [s]	Mittel [%]
Kontrolle	200	170	180	210	190	100
Epothilon A	95	60	70	70	74	39
Epothilon B		23	25	30	26	14
Epothilon C	125	76	95	80	94	49
Epothilon D	125	73	120		106	56
Epothilon E	80	60	50	45	59	31
Epothilon F	80	40	30	50	50	26

Standardtest mit 0,9 mg Tubulin/ml und 1 µM Probenkonzentration

Der Polymerisationstest ist ein in vitro Test mit gereinigtem Tubulin aus Schweinehirn. Die Auswertung erfolgt photometrisch. Polymerisationsfördernde Substanzen wie die Epothilone verkürzen die Zeit, bis zu der halbmaximale Polymerisation erfolgt ist, d. h., je kürzer die Zeit, desto wirksamer die Verbindung. w, x, y und z sind vier unabhängige Versuche, die relative Wirksamkeit ist in der letzten Spalte in % der Kontrolle ausgedrückt; wieder zeigen die niedrigsten Werte die beste Wirksamkeit an. Die Rangliste entspricht ziemlich genau der in Zellkulturen festgestellten.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Gesellschaft für
Biotechnologische
Forschung mbH
Mascheroder Weg 1
3300 Braunschweig

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
Name: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Address: Mascheroder Weg 1 3300 Braunschweig	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 6773 Date of the deposit or of the transfer[1]: 1991-10-28

III. VIABILITY STATEMENT

The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1991-10-28 .[2]
On that date, the said microorganism was

(X)[3] viable

()[3] no longer viable

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED[4]

IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: DSM DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 1991-11-05

[1] Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

[2] In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

[3] Mark with a cross the applicable box.

[4] Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form DSM-BP/9 (sole page) 0787

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Gesellschaft für
Biotechnologische
Forschung mbH
Mascheroder Weg 1
3300 Braunschweig

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR So ce 90	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 6773

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I. above was accompanied by:

() a scientific description
(X) a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts this microorganism identified under I. above, which was received by it on 1991-10-28 (Date of original deposit)[1]

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Adress: Mascheroder Weg 1 B D-3300 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Dagmar Tittel Date: 1991-11-05

[1] Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Patentansprüche

1. Epothilone, dadurch gewinnbar, daß man

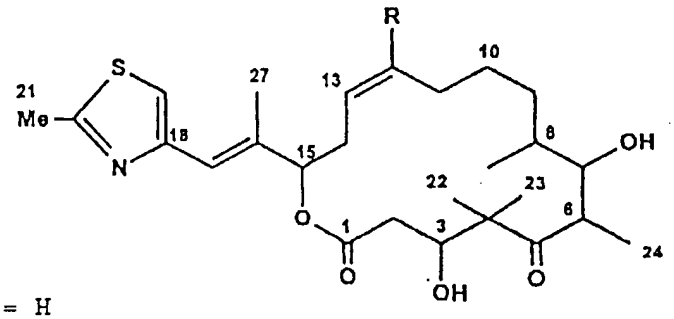
(a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert,
(b) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt und mit einem Wasser/Methanol-Gemisch wäscht,
(c) das gewaschene Adsorberharz mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,
(d) das gewonnene Konzentrat mit Ethylacetat extrahiert, den Extrakt einengt und zwischen Methanol und Hexan verteilt,
(e) die methanolische Phase zu einem Raffinat einengt und das Konzentrat an einer Sephadex-Säule fraktioniert,
(f) eine Fraktion mit Stoffwechselprodukten des eingesetzten Mikroorganismus gewinnt,
(g) die gewonnene Fraktion an einer C18-Umkehrphase mir einem Methanol/Wasser-Gemisch chromatographiert und in zeitlicher Reihenfolge
- nach einer ersten Fraktion mit Epothilon A und
- einer zweiten Fraktion mit Epothion B

- eine dritte Fraktion mit einem ersten weiteren Epothilon und
- eine vierte Fraktion mit einem zweiten weiteren Epothilon gewinnt und

(h1) und das Epothilon der ersten weiteren Fraktion und /oder
(h2) das Epothilon der zweiten weiteren Fraktion isoliert.

2. Epothilon der Summenformel $C_{26}H_{39}NO_5S$, **gekennzeichnet** durch das 1H- und 13C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

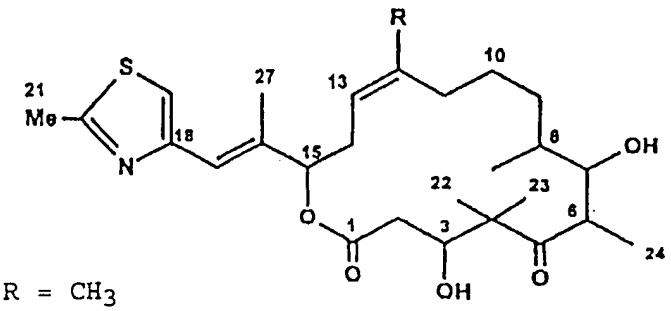
3. Epothilon C der Formel:



Epothilon C R = H

4. Epothilon der Summenformel $C_{27}H_{41}NO_5S$, **gekennzeichnet** durch das ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektrum gemäß Tabelle 1.

5. Epothilon D der Formel:



Epothilon D R = CH_3

6. Biotransformant von Epothilon A, dadurch gewinnbar, daß man

(a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon A versetzt,

(b) die mit Epothilon A versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,

(c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,

(d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,

(e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial:	Nucleosil 100 C-18 7 µm
Säulenmaße:	250 x 16 mm
Laufmittel:	Methanol/Wasser = 60 : 40
Fluß:	10 ml/min

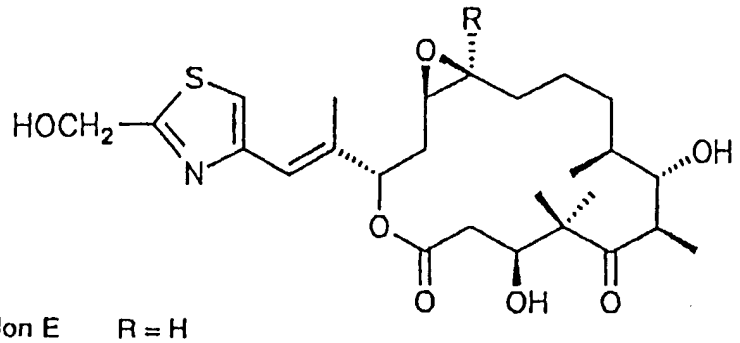
und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem R_t-Wert von 20 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

7. Biotransformant von Epothilon A nach Anspruch 6, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

8. Biotransformant von Epothilon A nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

9. Verbindung der Summenformel $C_{26}H_{39}NO_7S$, gekennzeichnet durch folgendes ^1H-NMR-Spektrum (300 MHz, $CDCl_3$): delta = 2.38 ($2\text{-}H_a$), 2.51 ($2\text{-}H_b$), 4.17 (3-H), 3.19 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, $9\text{-}H_2$, $10\text{-}H_2$, $11\text{-}H_2$), 2.89 (12-H), 3.00 (13-H), 1.88 ($14\text{-}H_a$), 2.07 ($14\text{-}H_b$), 5.40 (15-H), 6.57 (17-H), 7.08 (19-H), 4.85 ($21\text{-}H_2$), 1.05 ($22\text{-}H_3$), 1.32 ($23\text{-}H_3$), 1.17 ($24\text{-}H_3$), 0.97 ($25\text{-}H_3$), 2.04 ($27\text{-}H_3$)

10. Verbindung (Epothilon E) der Formel:



Epothilon E R = H

11. Biotransformant von Epothilon B, dadurch gewinnbar, daß man

(a) *Sorangium cellulosum* DSM 6773 in Gegenwart eines Adsorberharzes in an sich bekannter Weise kultiviert, vom Adsorberharz abtrennt und gegebenenfalls die Gesamtmenge oder einen Teil der abgetrennten Kultur mit einer methanolischen Lösung von Epothilon B versetzt,

(b) die mit Epothilon B versetzte Kultur inkubiert und danach mit Adsorberharz versetzt,

(c) das Adsorberharz von der Kultur abtrennt, mit Methanol eluiert und das Eluat zu einem Rohextrakt einengt,

(d) den Rohextrakt zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt, die Ethylacetat-Phase abtrennt und zu einem Öl einengt,

(e) das Öl an einer Umkehrphase unter folgenden Bedingungen chromatographiert:

Säulenmaterial:	Nucleosil 100 C-18 7 µm
Säulenmaße:	250 x 16 mm
Laufmittel:	Methanol/Wasser = 60 : 40
Fluß:	10 ml/min

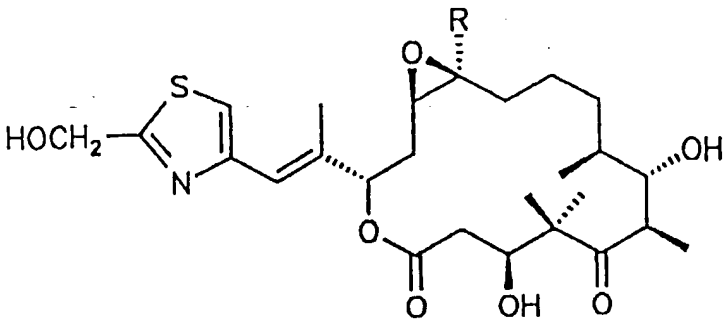
und Fraktionen mit einem Gehalt an Biotransformant, die sich durch UV-Löschung bei 254 nm detektieren lassen, mit einem R_t-Wert von 24,5 min abtrennt und den Biotransformanten isoliert.

12. Biotransformant nach Anspruch 11, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (a) eine Kultur abtrennt, die drei oder vier oder mehr Tage alt ist.

13. Biotransformant nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gewinnbar, daß man bei Stufe (b) ein oder zwei oder mehr Tage inkubiert.

14. Verbindung der Summenformel $C_{27}H_{41}NO_7S$, **gekennzeichnet** durch folgendes ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MH_z, $CDCl_3$): delta = 2.37 (2-H_a), 2.52 (2-H_b), 4.20 (3-H), 3.27 (6-H), 3.74 (7-H), 1.30 - 1.70 (8-H, 9-H_2, 10-H_2, 11-H_2), 2.78 (13-H), 1.91 (14-H), 2.06 (14-H_b), 5.42 (15-H), 6.58 (17-H), 7.10 (19-H), 4.89 (21-H_2), 1.05 (22-H_3), 1.26 (23-H_3), 1.14 (24-H_3), 0.98 (25-H_3), 1.35 (26-H_3), 2.06 (27-H_3)

15. Verbindung (Epothilon F) der Formel:



Epothilon F R = CH_3

16. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

17. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehreren der Verbindungen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche oder einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Fig. 1

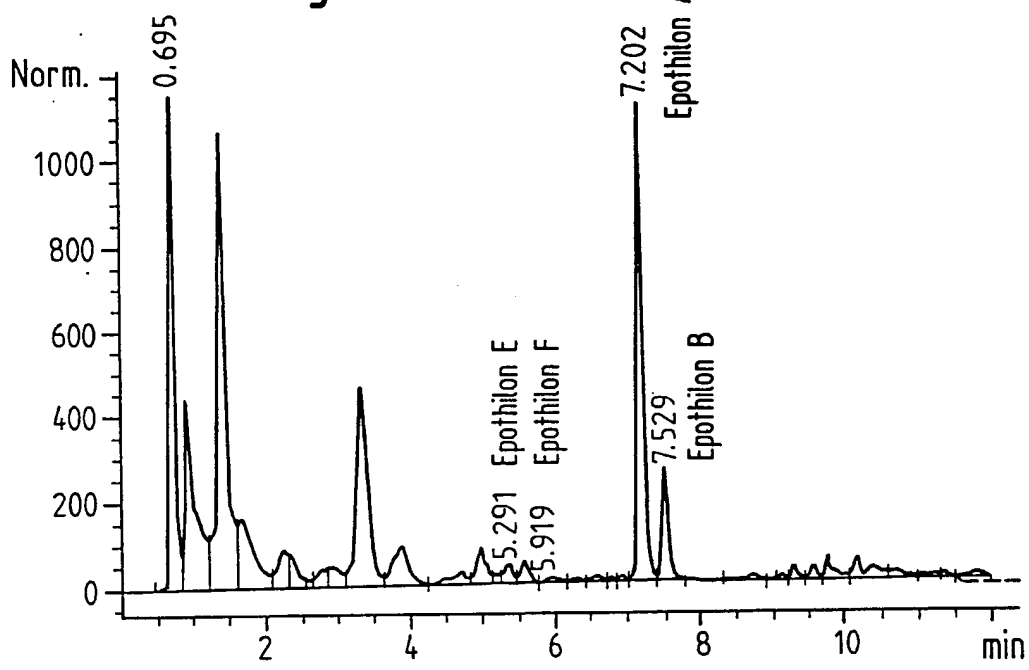

Norm.
1000
800
600
400
200
0
0.695
7.202
Epothilon A
Epothilon E
Epothilon F
5.291
5.919
7.529
Epothilon B
2
4
6
8
10
min

Fig. 2

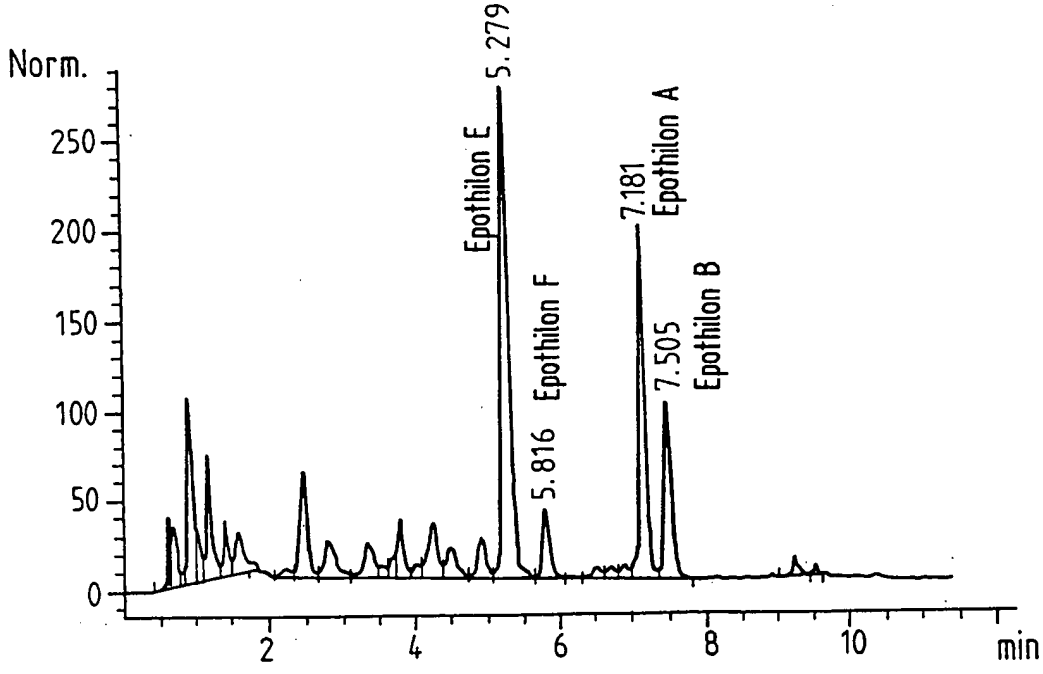

Norm.
250
200
150
100
50
0
5.279
Epothilon E
Epothilon F
5.816
7.181
Epothilon A
7.505
Epothilon B
2
4
6
8
10
min

Fig. 3

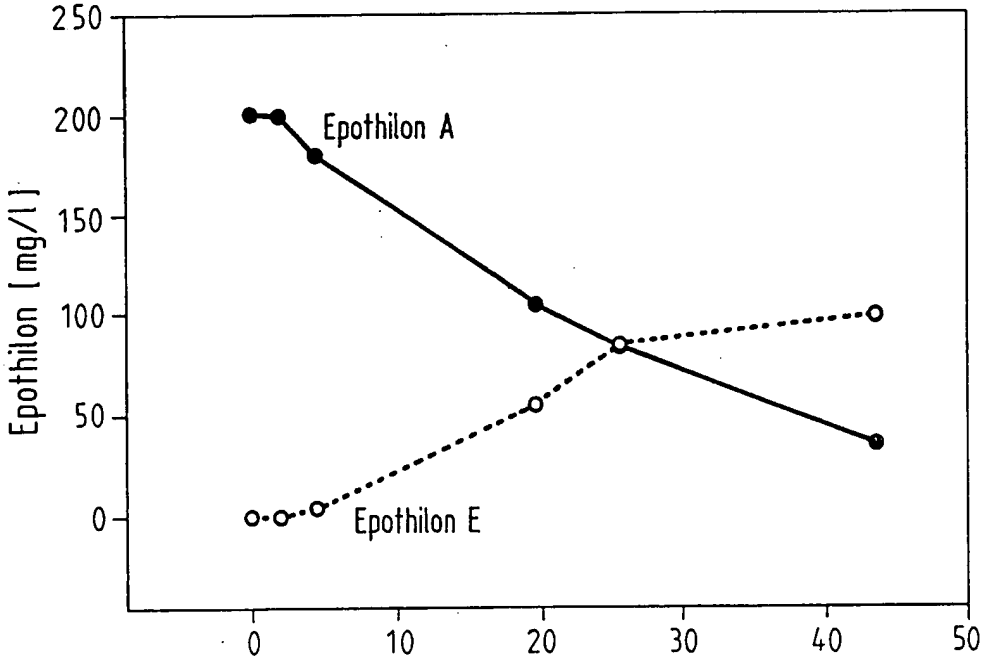

250
200
150
100
50
0
Epothilon [mg/l]
Epothilon A
Epothilon E
0
10
20
30
40
50

Fig. 4

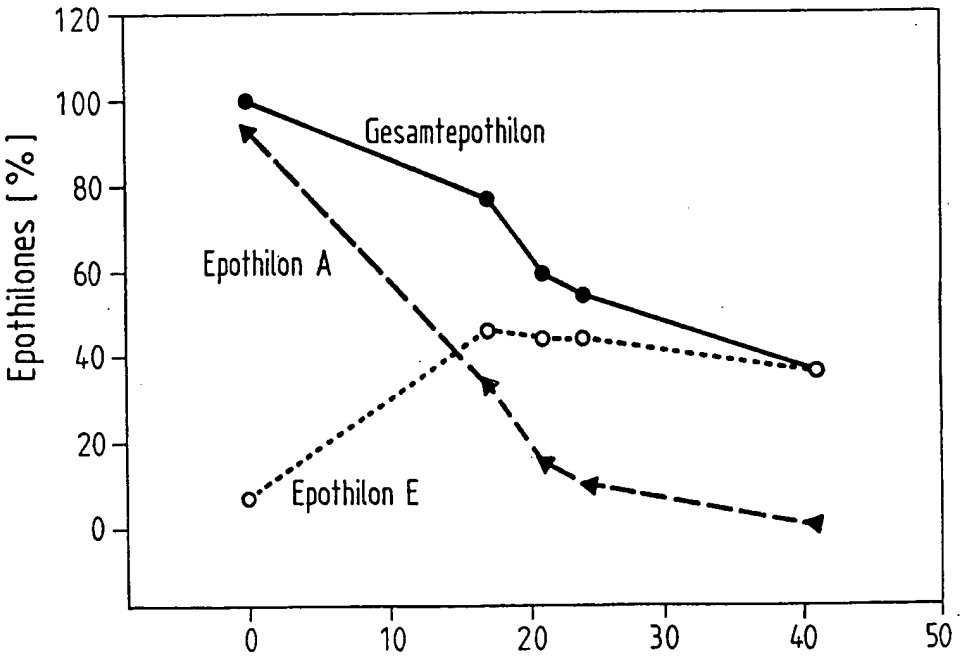
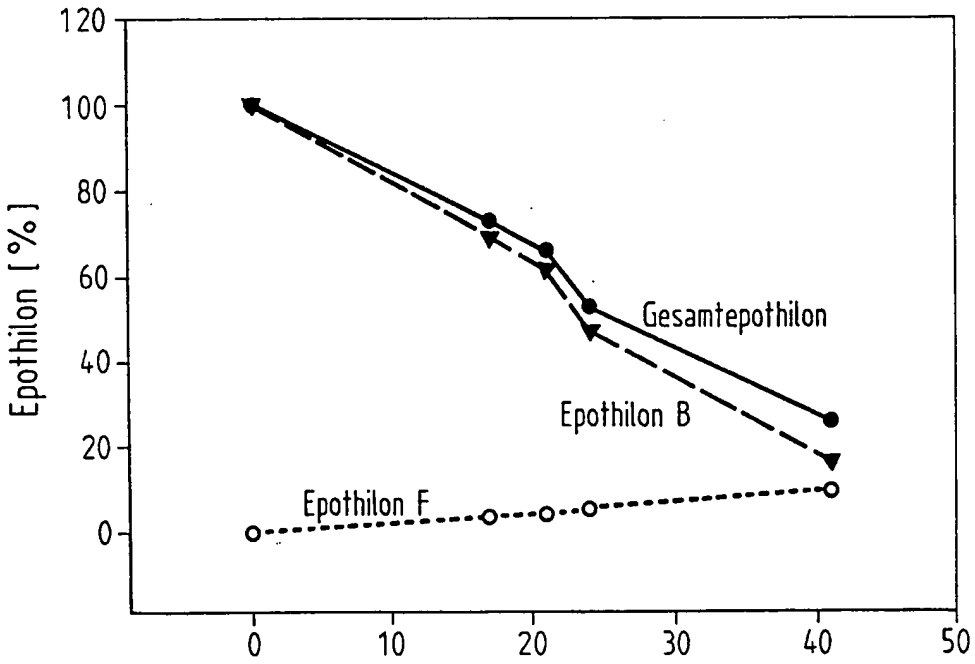

120
100
80
60
40
20
0
Epothilones [%]
Gesamtepothilon
Epothilon A
Epothilon E
0
10
20
30
40
50

Fig. 5


120
100
80
60
40
20
0
Epothilon [%]
0
10
20
30
40
50
Gesamtepothilon
Epothilon B
Epothilon F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. nal Application No
PCT/EP 97/06442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07D417/06 C07D493/04 C12P17/08 A01N43/78 A61K31/425
//(C07D493/04,313:00,303:00)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) & CIBA GEIGY AG) 27 May 1993 see claims 1,5-8 & DE 41 38 042 A (GBF) 27 May 1993 cited in the application ---	1,16,17
P,X	BALOG A. ET AL.: "Total synthesis of (-)-epothilone A" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, vol. 35, no. 23/24, 3 January 1997, pages 2801-2803, XP002035359 see compound 23; page 2803 --- -/--	1-3

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 March 1998	09. 04. 98

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hartrampf, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna[illegible]onal Application No
PCT/EP 97/06442

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 97 19086 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF)) 29 May 1997 cited in the application see page 22 - page 26; claims 12,13; example 15 ---	1-5,10, 16,17
E	WO 98 08849 A (NOVARTIS AKTIENGESELLSCHAFT) 5 March 1998 see compounds 19 and 19a, page 32 see claims 2,9 ---	2-5
A	NICOLAOU K.C. ET AL.: "An approach to epothilones based on olefin metathesis" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, vol. 35, no. 20, 4 November 1996, pages 2399-2401, XP002035372 -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. ..ial Application No
PCT/EP 97/06442

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9310121 A	27-05-93	DE 4138042 A	27-05-93
		AU 2943792 A	15-06-93
WO 9719086 A	29-05-97	DE 19542986 A	22-05-97
		DE 19639456 A	26-03-98
WO 9808849 A	05-03-98	DE 19636343 C	23-10-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nales Aktenzeichen
PCT/EP 97/06442

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07D417/06 C07D493/04 C12P17/08 A01N43/78 A61K31/425
//(C07D493/04,313:00,303:00)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 10121 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) & CIBA GEIGY AG) 27.Mai 1993 siehe Ansprüche 1,5-8 & DE 41 38 042 A (GBF) 27.Mai 1993 in der Anmeldung erwähnt ---	1,16,17
P,X	BALOG A. ET AL.: "Total synthesis of (-)-epothilone A" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, Bd. 35, Nr. 23/24, 3.Januar 1997, Seiten 2801-2803, XP002035359 siehe Verbindung 23; Seite 2803 --- -/--	1-3

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
27.März 1998	09. 04. 98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hartrampf, G

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. .nales Aktenzeichen
PCT/EP 97/06442

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 19086 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF)) 29.Mai 1997 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 22 - Seite 26; Ansprüche 12,13; Beispiel 15 ---	1-5,10, 16,17
E	WO 98 08849 A (NOVARTIS AKTIENGESELLSCHAFT) 5.März 1998 siehe Verbindungen 19 und 19a, Seite 32 siehe Ansprüche 2,9 ---	2-5
A	NICOLAOU K.C. ET AL.: "An approach to epothilones based on olefin metathesis" ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION IN ENGLISH, Bd. 35, Nr. 20, 4.November 1996, Seiten 2399-2401, XP002035372 -----	1-17

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. ales Aktenzeichen
PCT/EP 97/06442

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9310121 A	27-05-93	DE 4138042 A	27-05-93
		AU 2943792 A	15-06-93
WO 9719086 A	29-05-97	DE 19542986 A	22-05-97
		DE 19639456 A	26-03-98
WO 9808849 A	05-03-98	DE 19636343 C	23-10-97